

# PROTEÍNAS ANTICONGELANTES\*

## Introdução

Poucos animais permanecem ativos durante os meses gelados de inverno no hemisfério Norte. As aves voam para o Sul e os mamíferos terrestres hibernam em suas tocas. E o que acontece com os animais ectotérmicos, cujo metabolismo é insuficiente para manter a temperatura corporal constante, como rãs e tartarugas, insetos e aranhas, e que não conseguem encontrar um abrigo quente ou migrar grandes distâncias? Como eles se comportam quando a temperatura ambiente cai abaixo do ponto de congelamento de seus fluidos corporais? Algumas espécies conseguem evitar esse congelamento, enquanto outras congelam como se fossem pedras de gelo, sobrevivendo até a chegada da primavera. É o que acontece com algumas espécies de insetos do Ártico, que sobrevivem congelados durante 10 meses do ano em temperaturas abaixo de 50°C. Alguns peixes que vivem em ambiente polar, tipicamente sobrevivem em mares nos quais a temperatura da água é abaixo de zero, normalmente -1,9°C. Há relatos, desde meados do século passado, de temperaturas de congelamento anormalmente baixas do soro sanguíneo de peixes do Ártico.

Invertebrados que habitam a região entre marés das regiões frias, como cracas e mexilhões, podem congelar e descongelar duas vezes ao dia, de acordo com a maré alta ou baixa. No caso dos vertebrados, quatro espécies de rãs, *Rana sylvatica*, *Hyla crucifer*, *Hyla versicolor* e *Pseudacris triseriata*, podem sobreviver durante dias ou semanas de congelamento, com 65% de sua água corporal convertida em gelo. Uma espécie de salamandra siberiana, *Hynobius keyserlingia*, a única espécie de anfíbio hibernante da tundra, sobrevive à temperatura de -35°C. Há registros de que algumas espécies de tartarugas e serpentes que habitam as regiões frias também têm seus fluidos corporais congelados durante o inverno.

Passar o inverno congelado parece ser uma estratégia adaptativa perigosa, pois o congelamento é letal para a maioria das células. Os cristais de gelo rasgam as membranas celulares e danificam as organelas, o conteúdo celular extravasa, e os processos metabólicos essenciais para o funcionamento celular ficam prejudicados. Além disso, o congelamento bloqueia a respiração e a circulação, além de romper os vasos sanguíneos, interrompendo o acesso de oxigênio e outros nutrientes essenciais para a sobrevivência das células. O gelo se

---

\* Seminário apresentado pelo aluno RICARDO HUMMES RAUBER na disciplina BIOQUÍMICA DO TECIDO ANIMAL, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no primeiro semestre de 2009. Professor responsável pela disciplina: Félix H. D. González.

acumula em todos os compartimentos extracelulares, preenchendo a cavidade abdominal, a bexiga urinária, a pele e a musculatura.

Há duas alternativas que permitem aos animais ectotérmicos enfrentar temperaturas abaixo de zero. A primeira é evitar a exposição a temperaturas abaixo do ponto de congelamento dos fluidos corporais, escolhendo locais mais protegidos para se abrigar durante o inverno, como o fundo de lagos e tocas profundas no solo. A segunda alternativa, que consiste em evitar o congelamento, depende de adaptações específicas que permitam aos animais manter o estado líquido de seus fluidos corporais em temperaturas abaixo de zero.

A presença de nucleantes, que são partículas que podem dar início ao crescimento de cristais de gelo, fornece pontos de ligação para as moléculas de água formar a estrutura cristalina do gelo. O próprio gelo é o melhor nucleante, mas proteínas plasmáticas, bactérias e certas partículas desempenham idêntica função. Para conseguir estabilizar o estado líquido, os animais com essas adaptações eliminam as partículas nucleantes ou impedem que os nucleantes disparem a cristalização.

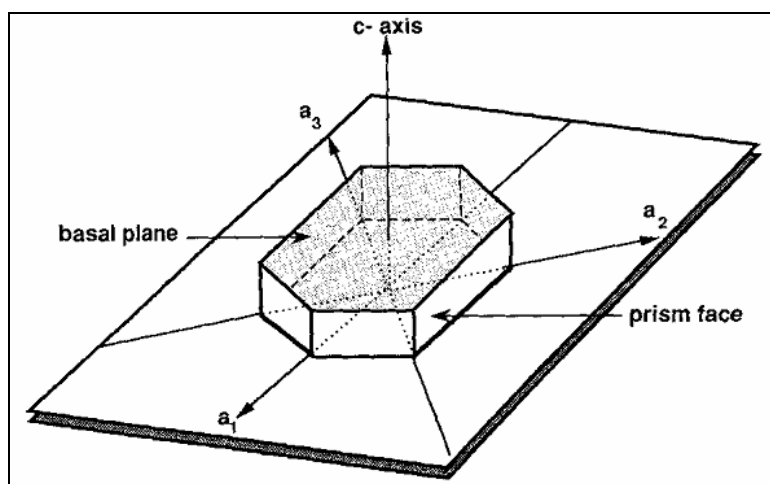
## **Formação do cristal de gelo**

Antes de apresentar os possíveis mecanismos de ação das proteínas anticongelantes é necessário entender alguns aspectos da formação dos cristais de gelo.

Quando a água pura, líquida, é resfriada à pressão atmosférica, ela não congela espontaneamente a 0°C. Ao invés disto, ela continua na sua forma líquida bem abaixo de 0°C. Neste ponto, é dito que a água está super-resfriada. Devido a flutuações na densidade da água líquida, as moléculas formam conjuntos com o mesmo arranjo molecular observado no cristal de gelo. Este processo é energeticamente desfavorável, pois tende a aumentar a energia total do sistema. Como resultado, estes conjuntos tendem a ser instáveis e se desfazerem rapidamente. Entretanto, com um resfriamento maior, a probabilidade de estes conjuntos aumentarem, em número e tamanho, aumenta. Quando estes conjuntos, também chamados de núcleos, atingem certa dimensão (numa relação crítica de tamanho/volume), seu crescimento adicional leva a uma redução na energia total do sistema (um processo favorável) e a cristalização do gelo acontece rapidamente. Este processo é chamado de **nucleação homogênea do gelo**. A temperatura na qual este processo ocorre (em torno de -40°C) é conhecida como **ponto inicial de super-resfriamento**.

Na prática, impurezas e partículas estranhas, usualmente presentes na água, aderem moléculas de água à sua superfície. Em algumas destas superfícies, as moléculas de água podem se orientar de uma forma a assemelhar-se a um núcleo. Submetidos a um resfriamento adicional, estes núcleos tornam-se compatíveis com um núcleo com dimensão crítica. Estas partículas são chamadas de **Ativadores da Nucleação do Gelo (ANG)** e o processo é chamado de **nucleação**

**heterogênea do gelo.** A partir do momento em que a formação do núcleo atinge a dimensão de um ativador de nucleação, a nucleação heterogênea do gelo ocorre, sempre, a uma temperatura superior à de nucleação homogênea do gelo. Temperaturas iniciais para este processo, normalmente estão entre  $-2^{\circ}\text{C}$  a  $-15^{\circ}\text{C}$ . De uma maneira geral, o gelo pode existir de várias formas, desde estruturas cristalinas polimórficas, até estruturas amórficas. Apesar disso, somente a forma hexagonal do gelo é estável à temperatura de  $0^{\circ}\text{C}$  em pressão normal. Esta estrutura é mostrada na Figura 1.



**Figura 1.** Representação de um cristal hexagonal de gelo. São mostradas a Face Prisma, o Plano Basal, o Eixo C e os três Eixos A ( $a_1$ ,  $a_2$  e  $a_3$ ).

## Proteínas e glicoproteínas

Os peixes polares evitam o congelamento por meio de proteínas anticongelantes presentes em seus fluidos corporais. Existem vários tipos de anticongelantes biológicos na natureza. Estes podem ser encontrados em várias espécies de peixes, plantas, anfíbios e insetos e são agrupados em duas categorias distintas de substâncias: proteínas anticongelantes (AFP) e glicoproteínas anticongelantes (AFGP). Quando os primeiros cristais de gelo começam a se formar dentro do peixe, estas proteínas rapidamente se ligam a esses cristais, impedindo a adição de mais moléculas de água ao cristal de gelo em formação. Muitos artrópodes terrestres, incluindo aranhas e insetos, possuem proteínas anticongelantes potentes o suficiente para impedir a formação de cristais de gelo em temperaturas abaixo de  $-15^{\circ}\text{C}$ .

As concentrações *in vivo* de AFGP variam de 4 a 50 mg/mL. Estas glicoproteínas são compostas por oito glicopeptídios distintos, que têm seu peso molecular variando de 2,6 a 34 KDa. As AFGP com peso molecular entre 20 e 33 KDa são nominadas desde AFGP-1 até

AFGP-4. Aquelas com peso molecular inferior a 20 KDa são conhecidas desde AFGP-5 a AFGP-8, sendo esta última a menor delas.

Tanto AFGP quanto AFP têm em sua composição o aminoácido alanina (ALA), representando cerca de 67% da composição de cada uma delas. Apesar disso, estruturalmente, AFGP e AFP são completamente diferentes. Na molécula de AFGP, o segundo aminoácido mais abundante é treonina (THR), seguindo um arranjo tripeptídico repetido (Ala-Ala-Thr). Algumas AFGP têm prolina (PRO) substituindo alanina após algumas treoninas. As moléculas de AFP podem ser classificadas como AFP I, AFP II e AFP III. Desta forma, AFP I tem como característica estrutural básica, ser constituída por 37 aminoácidos (peso molecular de 3 a 5 KDa) e possuir uma estrutura em  $\alpha$ -hélice. A AFP II tem em sua constituição 129 aminoácidos (peso molecular de 14 KDa) e é caracterizada pela presença de cinco pontes dissulfídricas. A AFP III, por seu turno, tem peso molecular intermediário (6 a 7 KDa), sendo constituída por 62 a 64 aminoácidos sem, no entanto, apresentar qualquer característica distinguível em termos de estrutura. É inegável que, no caso das AFP I, a estrutura em forma de  $\alpha$ -hélice tem papel fundamental no desempenho das funções especializadas destas proteínas.

Apesar das diferenças em composição aminoacídica e de estrutura das proteínas entre AFP e AFGP, sua interação com o gelo parece ocorrer da mesma forma. Elas não têm efeito algum sobre o ponto de fusão do gelo formado na sua presença. Somente o ponto de congelamento é alterado pela presença de AFP ou AFGP no sistema. A diferença entre o ponto de fusão e o ponto de congelamento é chamada de **histerese termal**. A observância deste fenômeno indica que a ação destas substâncias sobre a formação do gelo é de um mecanismo não coligativo.

A intensidade do efeito anticongelante destas substâncias é diretamente proporcional a sua concentração no meio. No entanto, parece haver um limiar de saturação, além do qual, qualquer incremento na concentração tanto de AFP quanto AFGP não provoca qualquer alteração adicional no ponto de congelamento do meio.

## **Mecanismo de ação proposto**

Muitas espécies de peixes marinhos têm sido estudadas para elucidar o mecanismo que garante sua sobrevivência, prevenindo a formação de gelo *in vivo*. Isto é possível, reduzindo-se efetivamente o ponto de congelamento abaixo da temperatura da água que os rodeia. No caso específico dos oceanos polares, a temperatura da água é de aproximadamente  $-1,8^{\circ}\text{C}$ . Curiosamente, esta depressão no ponto de congelamento não é obtida através do uso de substâncias coligativas como açúcares ou sais, quando o balanço da pressão osmótica das células seria afetado. Ao invés disto, estes organismos empregam unicamente proteínas e glicoproteínas para controlar o crescimento do gelo.

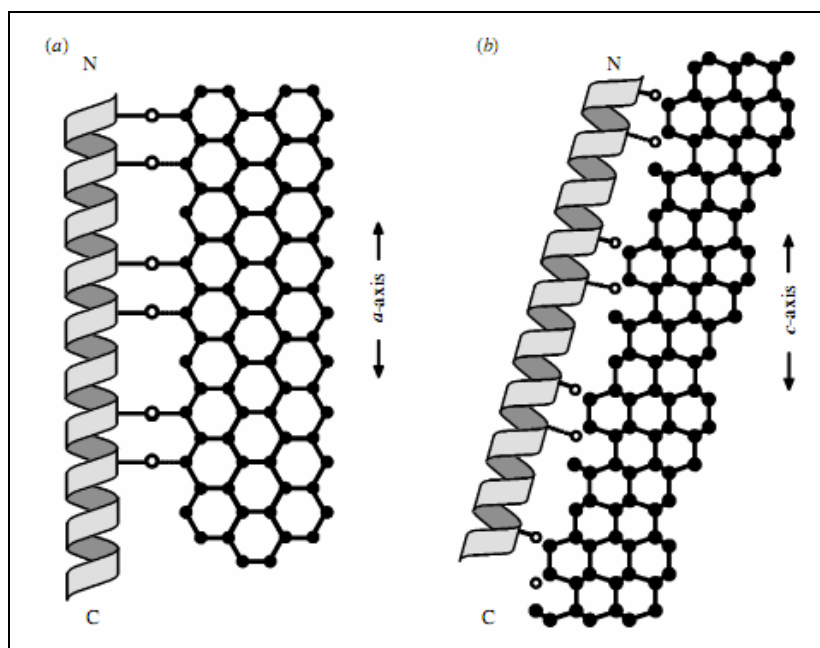
Diferenças estruturais entre AFP e AFGP têm dificultado o estabelecimento de uma hipótese unificada para o mecanismo molecular de ação destas substâncias. Tradicionalmente, os mecanismos estudados têm levado em consideração, exclusivamente, as AFP I e as AFGP devido ao fato de estar duas classes de proteínas terem sido mais bem caracterizadas em relação a outras classes. Apesar disso, descrever estes mecanismos em separado seria redundante, sendo que o mecanismo de uma complementa o de outra. Desta maneira, a discussão será conduzida sob o prisma das AFGP.

Tem sido demonstrado que as AFGP se ligam à superfície do gelo e inibem o seu crescimento. Apesar dos esforços em desenhar este mecanismo de ação, este ainda não está completamente elucidado.

Do ponto de vista macroscópico, o mecanismo tem relação com um processo de inibição por adsorção no qual as AFGP se ligam à superfície do gelo em crescimento. Neste estágio, o crescimento ocorre nas superfícies adjacentes às moléculas de AFGP no gelo, levando a um crescimento em curvaturas. Devido ao alto custo energético para se adicionar moléculas de água a esta estrutura convexa, há uma redução no ponto de congelamento, enquanto o ponto de fusão permanece o mesmo. Este fenômeno é conhecido como **Efeito Kelvin** e a diferença entre o ponto de congelamento e o ponto de fusão como **Histerese Termal**.

Sob o prisma molecular, um entendimento de como estas moléculas inibem o crescimento do cristal de gelo ainda é inspiração para grandes debates. Considerava-se que as interações entre AFGP e a superfície do gelo se davam através de pontes de hidrogênio. No entanto, foi demonstrado, através de experimentos, que o número de pontes de hidrogênio formadas entre a AFGP e o gelo parecia ser insuficiente para explicar a forte ligação existente entre AFGP e o gelo. Recentemente, os pesquisadores têm se dividido em torno das ligações através de pontes de hidrogênio e o seu papel no mecanismo de ação das AFGP. Embora tenha sido proposto que as interações hidrofílicas entre um resíduo polar e as moléculas da água na superfície do gelo têm extrema importância, outros pesquisadores têm invocado a idéia de que contribuições entrópicas e entálpicas dos resíduos hidrofóbicos são essenciais para a adsorção na superfície do gelo. Apesar do fato de que contribuições entrópicas significativas podem ser obtidas pela exclusão de água da superfície de proteínas e do gelo, um mecanismo molecular detalhado invocando interações hidrofóbicas e/ou hidrofílicas com ênfase no papel que elas têm na adsorção das AFGP à superfície do gelo tem falhado em ser comprovadas.

Num esforço para conciliar o assunto, a ligação cooperativa das AFGP, bem como o papel da flexibilidade das cadeias laterais têm sido investigadas. Entretanto, outras complicações têm aparecido com a descoberta de que diferentes AFGP ligam-se a faces ou superfícies distintas no cristal de gelo (Figura 2). Não é surpresa, então, que uma hipótese unificada centrada no mecanismo molecular de ação não foi proposta.



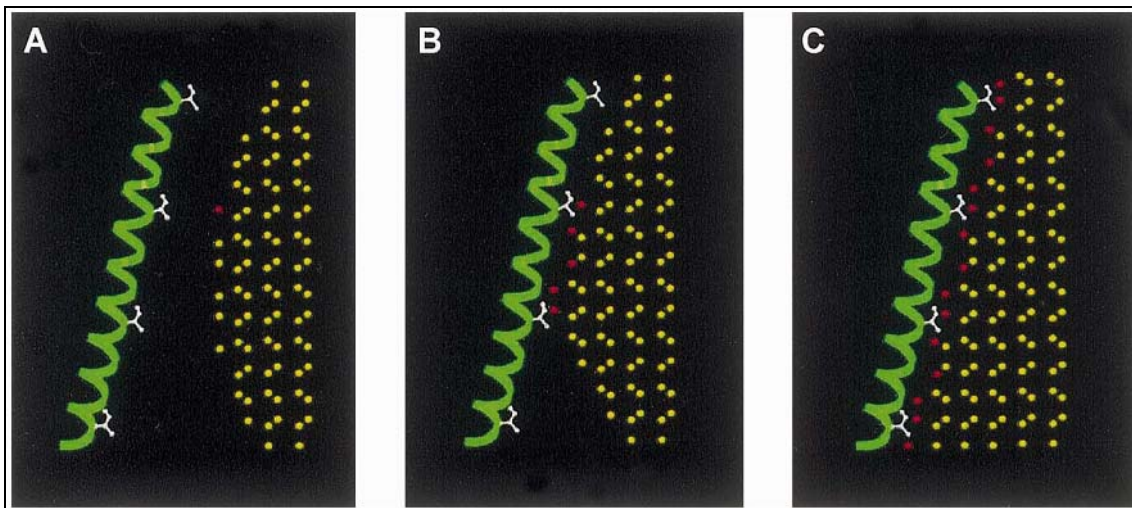
**Figura 2. Representação da ligação entre AFGP e o eixo-A (a) e a impossibilidade de ligação com o Eixo-c (b).**

Outro obstáculo para elucidar o mecanismo molecular de ação das AFGP é que a interface água-gelo ainda não foi muito bem caracterizada. Esta interface não é uma transição abrupta, como é tipicamente representada em modelos estáticos. De fato, evidências recentes mostram a perda da estrutura organizada do gelo na interface como sendo razoavelmente gradual. Isto se torna problemático quanto se tenta mapear as possíveis interações entre a AFGP e a superfície do gelo. Devido ao fato de que modelos dinâmicos da interface água-gelo não terem sido ainda desenvolvidos, os modelos estáticos continuam a ser utilizados. Apesar desta limitação, uma introspecção valiosa tem sido obtida dos estudos de função-estrutura com AFP e AFGP, pois a essência de toda análise de estrutura-atividade é originada da **Teoria do Receptor**. Esta teoria é baseada no conceito geral de que um composto bioativo atua em um local receptor estruturalmente complementar. Deste ponto, o conhecimento das características físicas de um ligante que contribui positiva ou negativamente para a atividade, nos dá informações sobre as características físicas do local receptor.

Além dos mecanismos propostos acima, outros pesquisadores assumem que algumas AFP, principalmente AFP I, podem ter sua adsorção com a superfície do gelo através de forças de van der Waals. Neste sentido, alguns experimentos foram conduzidos, utilizando como sítio de pesquisa os resíduos de treonina em AFP I. Foram substituídas duas treoninas por valina, o que conservou o grupo metil (previamente existente nas treoninas), mas que eliminou o grupo hidroxil. A atividade da AFP valina variante foi a mesma daquela observada na AFP não

modificada. Em um estudo similar, todas as quatro treoninas foram substituídas por valina, mantendo a atividade da AFP original. Estes estudos demonstraram, especificamente, o grande papel que o grupo metil da treonina da AFP I tem na ligação com o gelo. Do mesmo modo, este trabalho também demonstrou de forma conclusiva que a ligação com o gelo pode ser mediada por interações de van der Waals.

Apesar de todas as especulações sobre as bases moleculares para o mecanismo de ação das AFGP, fica evidente que, provavelmente, o mecanismo básico envolve mais de um modo de ligação entre AFGP e o gelo. Desta forma, basta determinar o número e a variedade de interações necessárias para consolidação da atividade anticongelante. Em outras palavras, qual é o requerimento estrutural mínimo e o número de unidades ligantes para uma proteína se ligar ao gelo? Tudo indica que a atividade de AFGP não é do tipo “tudo-ou-nada”, mas sim, que pode ocorrer gradualmente sobre o comprimento da AFGP a partir do momento que a primeira unidade de contato é formada (Figura 3).



**Figura 3. Ligação gradual da AFP I à superfície do gelo. Em (A), o ponto vermelho indica a unidade de contato. O gelo vai ser formando até os limites estabelecidos pela AFP (B e C).**

### **Possíveis aplicações das proteínas anticongelantes**

Há vários processos complexos que ocorrem quando a temperatura da célula é reduzida próximo ou abaixo da temperatura de congelamento. Três modos distintos de morte celular são conhecidos neste caso: ruptura física da célula, necrose e apoptose induzida pelo frio. Apesar de todos estes processos serem significativos, a ruptura celular é a forma mais comum de morte celular nos casos de crioproteção.

Devido à descoberta acidental de que glicerol permite que espermatozóides de aves sobrevivam ao congelamento a  $-70^{\circ}\text{C}$ , muitos esforços têm sido aplicados no desenvolvimento de melhores técnicas de preservação e crioproteção. Todas as células são, de uma forma ou outra, sistemas compartimentalizados e a probabilidade de ocorrência de nucleação (do gelo) é diretamente proporcional ao grau de super-resfriamento e ao volume. Conseqüentemente, à medida que a temperatura é reduzida, a nucleação do gelo tem maior possibilidade de ocorrer fora da célula, uma vez que o volume de líquido é maior ali e a concentração de substâncias coligativamente ativas (sais, proteínas, etc.) é menor do que dentro da célula. Depois que a nucleação ocorre, o crescimento do gelo extracelular resulta em um aumento na concentração de solutos, devido à diminuição do volume extracelular. Como a concentração de solutos aumenta, a pressão osmótica extracelular, também aumenta. A taxa em que este aumento ocorre é diretamente proporcional à taxa de super-resfriamento e a célula compensa este fluxo osmótico regulando o fluxo de água através das suas membranas semipermeáveis. Quando a taxa de crescimento do gelo extracelular é muito rápida, a membrana celular tende a fraturar. A partir desta fratura, o crescimento de gelo intracelular ocorre e o passo seguinte é a destruição da célula.

A fim de manter a viabilidade celular nos casos de criopreservação, as AFGP e AFP têm sido utilizadas, uma vez que elas inibem a formação e o crescimento dos cristais de gelo no meio extracelular. Isto tem sido demonstrado, com a utilização destas substâncias para a preservação de oócitos suínos, os quais são extremamente sensíveis a temperaturas baixas.

A incorporação de genes precursores de AFGP/AFP em peixes que não produzem estas proteínas e, conseqüentemente, são vulneráveis a baixas temperatura, como o salmão, por exemplo, representa uma alternativa interessante para que estes peixes possam ser criados em águas com temperaturas abaixo do ponto de congelamento.

Outra possível aplicação, através de biologia molecular, das proteínas anticongelantes é a incorporação destas a plantas sensíveis ao frio. Isto foi demonstrado pela inclusão do gene para produção de AFP em batata, o que resultou em uma diminuição significativa no congelamento espontâneo a baixas temperaturas. Isto possibilitaria, também, que plantas sensíveis à geada, pudessem ser cultivadas em regiões mais frias.



## Referências bibliográficas

- BOUVET, V.; BEN, R. N. Antifreeze glycoproteins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 39, p. 133-144, 2003.
- CLARK, M. S.; WORLAND, M. R. How insects survive the cold: molecular mechanisms – a review, *Journal Comp. Physiol. B*, v. 178, p. 917-933, 2008.
- DAVIES, P. L.; BAARDSNES, J.; KUIPER, M. J.; WALKER, V. K. Structure and function of antifreeze proteins. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, v. 357, p. 927-935, 2002.
- DAVIES, P. L.; HEW, C. L. Biochemistry of fish antifreeze proteins. *The FASEB Journal*, v. 4, p. 2460-2468, 1990.
- DAVIES, P. L.; SYKES, B. D. Antifreeze proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 7, p. 828-834, 1997.
- EWART, K. V.; LIN, Q. HEW, C. L. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 55, p. 271-283, 1999.
- HEW, C. L.; YANG, D. S. C. Protein interaction with ice. *Eur. J. Biochem*, v. 203, p. 33-42, 1992.
- YEH, Y.; FEENEY, R. E. Antifreeze proteins: structures and mechanism of function. *Chemical Reviews*, v. 96, p. 601-617, 1996.